Cryptogamie, Mycol. 1987, 8 (1) : 43-50

ANTAGONISTES ET HYPERPARASITES DU *FULVIA FULVA* (COOKE) CIFERRI

Interactions mycéliennes avec les champignons colonisant les taches de cladosporiose de la tomate

par Daniel LE PICARD, Yves TIRILLY et Bernard TRIQUE*

RÉSUMÉ. - Les observations en microscopie photonique montrent que des *Acremonium*, *Verticillium* et *Fusarium* vivent en cohabitation ou antagonisme discret avec le *Fulvia fulva*; par contre, les hyphes de l'*Hansfordia pulvinata* et de deux *Acremonium* se comportent en hyperparasites, réalisant des figures d'enroulement et même de pénétration. La microscopie électronique à balayage révèle que l'*H. pulvinata*, après une phase biotrophe, devient nécrotrophe, vidant le contenu cytoplasmique du *F. fulva*. Il est le plus apte à être utilisé en lutte biologique.

SUMMARY. - The observations in light microscopy show that some *Acremonium*, *Verticillium* and *Fusarium* are living in cohabitation or slight antagonism with *Fulvia fulva*; on the other hand, the hyphae of *Hansfordia pulvinata* and of two species of *Acremonium* act as hyperparasites : they realize coilings and even penetrations. The scanning electronic microscopy reveals that *H. pulvinata*, after a biotrophic phase, becomes necrotrophic, draining the cytoplasmic content of *F. fulva*. It is the most suitable to be used in biological control.

MOTS CLÉS : Antagonisme mycélien, cladosporiose, *Fulvia fulva*, *Hansfordia pulvinata*, hyperparasitisme, lutte biologique, tomate.

INTRODUCTION

La cladosporiose de la tomate, due au *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri (syn. : *Cladosporium fulvum* Cooke) provoque des dégâts de plus en plus importants dans les cultures en serre.

Dès 1978, nous avions observé, pour la première fois en France, que l'*Hansfordia pulvinata* (Berk. et Curt.) Hughes (syn. : *H. grisella* (Sacc.) Hughes) était capable de couvrir d'un discret duvet blanc grisâtre les taches sporulées de *F. fulva*, inhibant le développement de ce parasite (PERESSE & LE PICARD,

* Laboratoire de Microbiologie appliquée, Faculté des Sciences et Techniques, 29287 Brest Cedex.

1979). Nous avons alors préconisé l'utilisation de cette aptitude pour mettre au point un procédé de lutte biologique (PERESSE & LE PICARD, 1980).

Plusieurs autres champignons appartenant aux genres *Acremonium*, *Fusarium*, *Verticillium* ont été, par la suite, isolés des taches foliaires de cladosporiose.

Le but de cette étude est de mieux cerner les relations étroites pouvant s'établir entre le *Fulvia fulva* et ces divers champignons, notamment l'*Hansfordia pulvinata*. L'examen des interactions mycéliennes permet en effet de préciser l'intérêt respectif des différentes espèces dans le cadre du développement d'une lutte biologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention des isolats

Des essais d'isolement ont été réalisés à partir de mycélium recouvrant les taches de cladosporiose. Les prélèvements ont été faits sur plants de tomate cultivés en serre dans la région brestoise, en 1978, pour l'*Hansfordia pulvinata*, entre 1983 et 1986 pour les autres champignons.

Milieux de culture

Les isolats ont été entretenus sur P.D.A. ou extrait de malt gélosé à 2 p. 100.

Les microcultures en milieu liquide ont été effectuées en utilisant la technique des «gouttes pendantes» (PERESSE & LE PICARD, 1980).

Infections expérimentales en chambre climatisée

Des cultures de plants de tomate de la variété «Luca» ont été menées en chambre climatisée selon des conditions précédemment décrites (TIRILLY & TRIQUE, 1984). Des plants âgés de cinq à sept semaines sont infectés par pulvérisation d'une suspension de 5.10^3 spores/ml de *F. fulva* à la face inférieure des feuilles. Trois semaines plus tard, les autres champignons sont apportés par pulvérisation d'une suspension de 10^6 spores/ml au niveau des taches sporulées du *F. fulva*.

Examen des interactions mycéliennes «in vitro»

Une suspension de spores de *F. fulva* est étalée sur milieu P.D.A. en boîte de Pétri. Le même jour, ou 2 jours plus tard, est apporté un fragment mycélien du champignon à tester. Les zones d'inhibition et les recouvrements mycéliens sont notés après une semaine d'incubation à 22°C.

L'observation microscopique des interactions est faite sur lame de verre : de petits blocs de P.D.A. ou d'extrait de malt gélosé distants de 3 mm sont ensemencés, l'un par le *F. fulva*, l'autre par l'autre champignon, puis recouverts d'une lamelle. Ce dispositif permet une bonne observation.

Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage

Après vérification au microscope photonique, les zones présentant des figures de contact, en boîte de Pétri ou sur feuille de tomate, sont prélevées. Les échan-

tillons sont fixés par passages successifs dans une solution de glutaraldéhyde (à 4 % dans un tampon phosphate pH 7,2, 1 h 30 mn) et d'osmium (à 2 %, 1 h). Ils sont ensuite déshydratés dans une série de dilutions d'alcool éthylique, puis d'acétone, portés au point critique et métallisés à l'or.

Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope Jeol JSM 35 à 15 kV.

RÉSULTATS

1. INTERACTIONS OBSERVÉES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Lors des essais d'infection en chambre climatisée, tous les champignons testés ont révélé la même aptitude que dans la nature à s'implanter sur les taches sporulées de cladosporiose.

Les observations microscopiques permettent cependant de reconnaître deux catégories : les antagonistes et les hyperparasites.

— **Les antagonistes** : des *Acremonium*, *Verticillium* et un *Fusarium* provoquent, du fait du recouvrement, une granulation et une vacuolisation du cytoplasme du *F. fulva*. L'atteinte du parasite est irrégulière et lente; on trouve tous les termes de passage entre une cohabitation et un antagonisme discret qui ne s'accompagne pas de mécanismes hyperparasitaires. Aucune des souches concernées ne montre de figures d'enroulements ou de pénétration du mycélium et des spores du *F. fulva*.

— **Les hyperparasites** : seules trois espèces fongiques ont provoqué des figures d'hyperparasitisme à l'égard du *F. fulva*.

Un *Acremonium* sp. a établi des contacts suivis d'enroulements et de pénétration des hyphes et des spores du *F. fulva* puis d'un développement intramycélien.

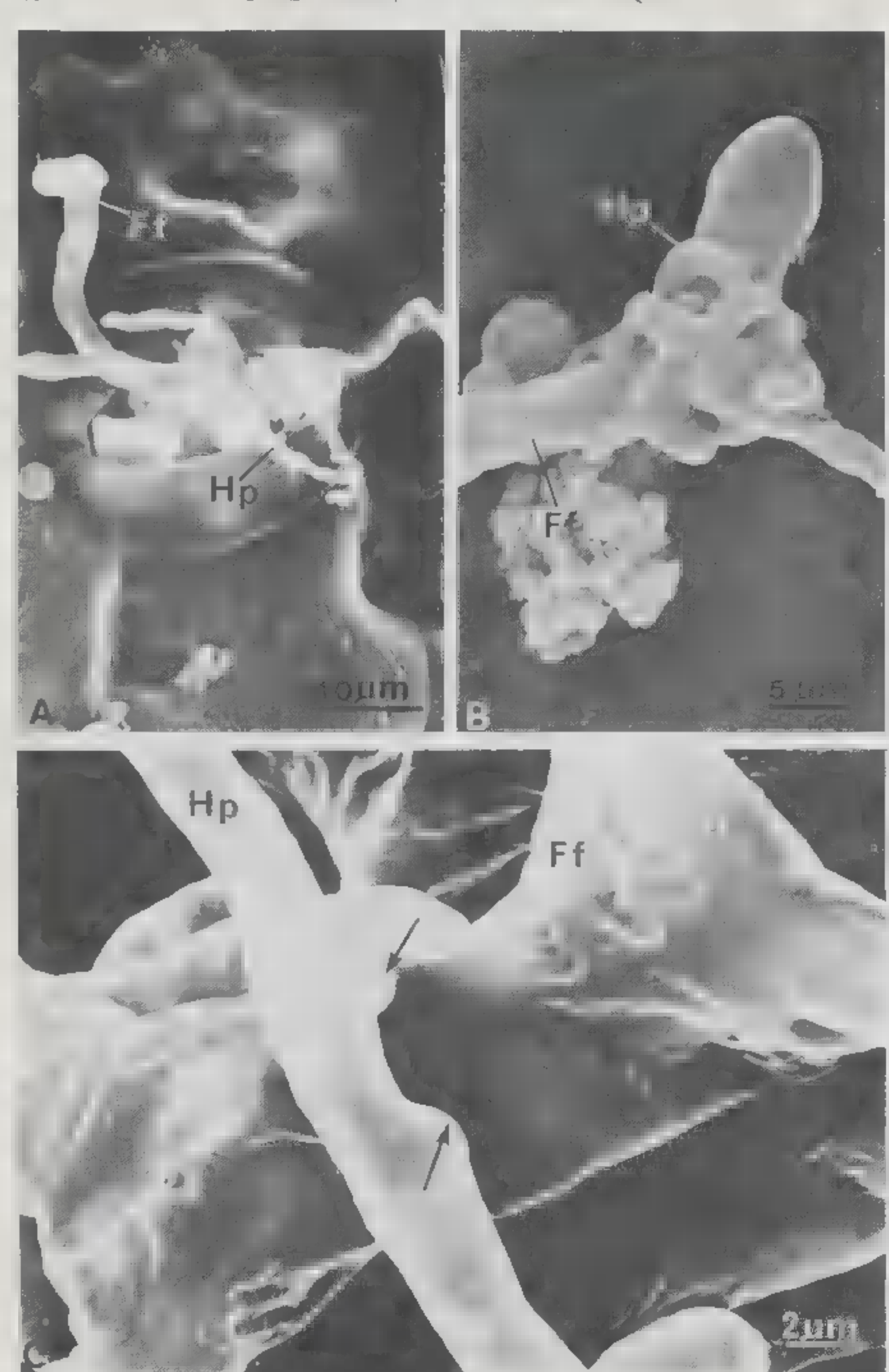
Les attaques d'un autre *Acremonium*, que nous rapportons à l'espèce *A. strictum* W. Gams (syn. : *Cephalosporium acremonium* auct. plur.), en diffèrent par une fréquence plus grande des figures d'enroulement et par une croissance intramycélienne plus rare.

Dans tous les cas, le parasitisme de l'*Hansfordia pulvinata* manifeste ses effets beaucoup plus rapidement : il est capable de recouvrir les taches de *F. fulva* et de provoquer sa mort dans les 3 ou 4 jours qui suivent son apport. Le mycélium et les spores du *F. fulva* apparaissent vides et déformés.

Les filaments des hyperparasites sont apparus particulièrement fins (diamètre moyen : 2 à 3 µm contre 4 à 5 µm pour le *F. fulva*).

2. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE

L'*Hansfordia pulvinata* offrant le plus d'intérêt dans l'optique d'une lutte biologique contre la cladosporiose de la tomate, nous avons limité nos observations en microscopie électronique aux confrontations *H. pulvinata* - *F. fulva*


Ff
Hp
10µm
A
Hp
Ff
5 µm
B
Hp
Ff
2µm

tant sur du matériel infecté naturellement que sur des taches résultant d'infections expérimentales.

Dès l'émergence des hyphes du *F. fulva* par les stomates de la feuille de tomate, l'*H. pulvinata* peut établir des contacts avec son hôte (Fig. 1, A). Dans une première phase biotrophe, les filaments de l'*H. pulvinata* émettent en direction du *F. fulva* des rameaux télémorphiques qui viennent s'enrouler autour des hyphes et des spores de ce dernier, constituant des nœuds plus ou moins complexes (Fig. 1, B). Ces filaments présentent, de part en part, des renflements se réduisant à de petits boutons fortement appliqués contre les hyphes de l'hôte, jouant ainsi le rôle d'appressorium (Fig. 2, A-B). Des digitations sont observables sur la paroi de l'hyperparasite au niveau des zones de contact, mais il n'apparaît pas d'orifice mettant en relation les deux cytoplasmes (Fig. 2, B).

Le processus se poursuit par une phase nécrotrophe au cours de laquelle le cytoplasme du champignon parasité se vacuolise et devient granuleux. Cette étape déjà observable en microscopie photonique précède la mort des articles mycéliens et des spores atteintes qui, vidées de tout contenu cytoplasmique, présentent des parois affaissées.

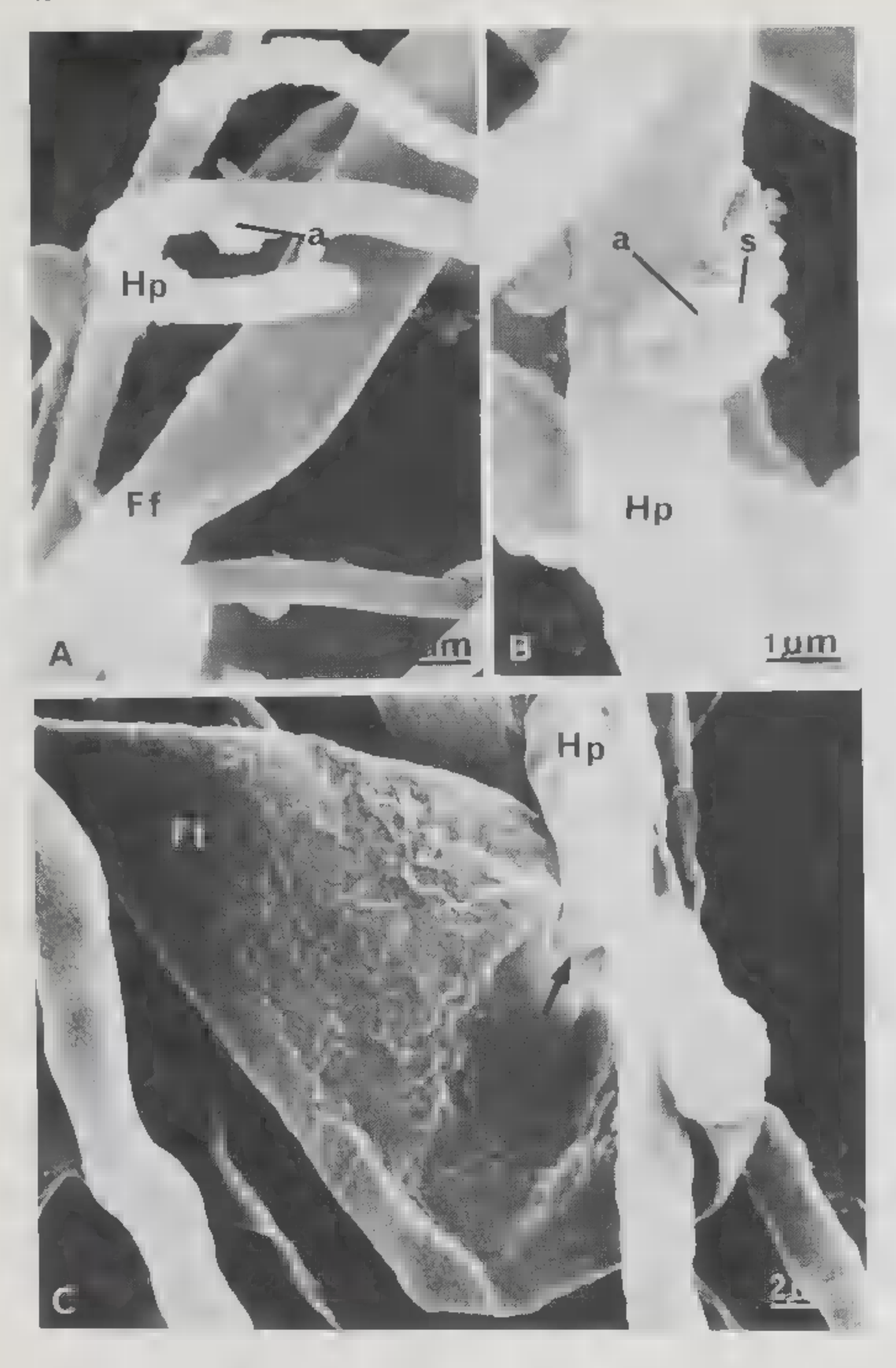
Quelques rares figures de pénétration de l'*H. pulvinata* dans les éléments du *F. fulva* ont été observées (Fig. 2, C) sans qu'un développement intramycélien s'en suive.

DISCUSSION

Parmi les champignons que nous avons isolés des taches de cladosporiose de la tomate, seules trois espèces révèlent une réelle aptitude parasitaire. Les autres, qui envahissent surtout les taches âgées, sont des saprophytes foliaires dont le développement est favorisé localement par la présence de vieux filaments plus ou moins autolysés de *F. fulva* et par les nécroses des tissus foliaires sous-jacents. Le mycoparasitisme de ces trois espèces se développe de façon différente. «In vivo» et «in vitro», les contacts, nombreux sur feuille de tomate, sont plus rares sur milieux gélosés, en particulier pour les *Acremonium*. Par ailleurs, en milieu liquide, seul l'*H. pulvinata* peut parasiter le *F. fulva*. Mais comme le soulignent KAPOORIA & MENDGEN (1985), lors d'études sur *Uromyces fabae* (Persoon)

Figure 1 – A. Dès leur sortie par les stomates de la feuille de tomate, les hyphes de *Fulvia fulva* (F. f.) sont parasitées par celles d'*Hansfordia pulvinata* (H. p.). B. Le mycélium d'*Hansfordia pulvinata* (H. p.) s'enroule autour des filaments du *Fulvia fulva* (F. f.) y constituant de véritables nœuds. C. Au niveau des contacts, l'*Hansfordia pulvinata* (H.p.) développe de petits appressoria (flèches).

Figure I – A. Immediately after their outburst through the leaf stromata of tomato, the hyphae of *Fulvia fulva* (F. f.) are parasitized by hyphae of *Hansfordia pulvinata* (H. p.). B. *Hansfordia pulvinata* (H. p.) mycelium coils around the filament of *Fulvia fulva* (F. f.) making real knots. C. At the place of contacts, *Hansfordia pulvinata* (H. p.) shows small appressoria (arrows).


a
Hp
Ff
A
a
s
Hp
B
1µm
Hp
C

Schroeter, la composition des parois d'un champignon peut varier selon les conditions de culture et interférer avec sa pathogénicité. Ceci peut également expliquer la perte de capacité mycoparasitaire d'une de nos souches d'*Acremonium* après plusieurs repiquages.

Les figures d'hyperparasitisme que nous avons observées sont similaires à celles décrites par d'autres auteurs : des interactions caractérisées par des enroulements d'hyphes mycéliennes suivis ou non de pénétrations sont connues chez de nombreuses espèces en présence d'autres champignons, notamment chez le *Rhizoctonia solani* Kühn (BUTLER, 1957), le *Gliocladium roseum* Bain. (BARNETT & LILLY, 1962), les *Trichoderma* (DENNIS & WEBSTER, 1971), le *Gonatobotrys simplex* Cda (HOCH, 1977b), le *Calcarisporium parasiticum* Barnett (HOCH, 1977a), le *Stephanoma phaeospora* Butler et Mc Cain (HOCH, 1978), le *Nematogonum ferrugineum* (Pers.) Hughes (WALKER & al., 1982) ou l'*Acladium tenellum* (Berk. et Curt.) Subram. (KUYKENDAL & al., 1983). On retrouve là les divers types de confrontations décrits par MOREAU C. & M. (1956).

Les premiers articles du *F. fulva* meurent 3 à 4 jours après l'apport de l'*H. pulvinata*. Une granulation et une vacuolisation des hyphes et des spores de l'hôte sont souvent notées. Ces phénomènes sont tardifs et précèdent de peu la destruction des articles concernés. Les parasites du *Rhizoctonia solani* (CHAND & LOGAN, 1984) montrent les mêmes diversités et méthodes d'attaque. Les hyperparasites du *F. fulva* sont nécrotrophes au sens défini par BARNETT & BINDER (1973) comme le sont de nombreuses espèces d'*Acremonium* décrites par RUDAKOV (1978).

La croissance de l'*Hansfordia* paraît stimulée par la présence du *F. fulva* dès le contact entre l'hôte et son parasite. Comme il y a peu de communications entre les filaments mycéliens, le mode d'action de l'*H. pulvinata* serait au moins partiellement lié à l'élaboration d'un sesquiterpène, qui a déjà été isolé des filtrats de culture, la désoxyphoménone (TIRILLY & al., 1983). En outre, une action au niveau des parois cellulaires et des membranes a été notée : la toxine favoriserait les activités glucanasiques et chitinasiques de l'hyperparasite (TIRILLY, résultats non publiés).

Parmi les champignons colonisant les taches de cladosporiose de la tomate, l'*Hansfordia pulvinata*, par ses caractères de croissance rapide et d'interactions mycéliennes, paraît le plus apte à être utilisé pour une lutte biologique.

Figure 2 — A. Après rupture artificielle des contacts, on observe distinctement l'appressorium (a) porté par une hyphe mycélienne d'*Hansfordia pulvinata* recourbée en crochet. B. Détail de l'appressorium (a) qui présente une surface de contact (s) digitée. C. Pénétration (flèche) d'une hyphe d'*Hansfordia pulvinata* (H. p.) dans une spore de *Fulvia fulva* (F. f).

Figure 2 — A. After artificial rupture of contacts, the appressorium (a) appears distinctly bore by an hypha of *Hansfordia pulvinata* (H. p.) B. Detail of appressorium (a) presenting a digitated contact surface (s). C. Penetration (arrow) of an hypha of *Hansfordia pulvinata* (H. p.) in a spore of *Fulvia fulva* (F. f.).

BIBLIOGRAPHIE

BARNETT H.L. and BINDER F.L., 1973 – The fungal host-parasite relationship. *Annual Rev. Phytopathol.* 11 : 273-292.

BARNETT H.L. and LILLY V.C., 1962 – A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. *Mycologia* 54 : 72-77.

BUTLER E.E., 1957 – *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. *Mycologia* 49 : 354-373.

CHAND T. and LOGAN C., 1984 – Antagonists and parasites of *Rhizoctonia solani* and their efficacity in reducing stem canker of potato under controlled conditions. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 83 : 107-112.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 – Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 363-369.

HOCH H.C., 1977a – Mycoparasitic relationships. III. Parasitism of *Physalospora obtusa* by *Calcarisporium parasiticum*. *Canad. J. Bot.* 55 : 198-207.

HOCH H.C., 1977b – Mycoparasitic relationships. *Gonatobotrys simplex* parasitic on *Alternaria tenuis*. *Phytopathology* 67 : 370-379.

HOCH H.C., 1978 – Mycoparasitic relationships. IV. *Stephanoma phaeospora* parasite on a species of *Fusarium*. *Mycologia* 70 : 370-379.

KAPOORIA R.G. and MENDGEN K., 1985 – Infection structures and their surface changes during differenciation in *Uromyces fabae*. *Phytopathol. Z.* 113 : 317-323.

KUYKENDAL W.R., HINDAL D.F. and BARNETT H.L., 1983 – Parasitism and nutrition of the contact mycoparasite *Acladium tenellum*. *Mycologia* 75 : 656-665.

MOREAU C. et MOREAU M., 1956 – Alliances et antagonismes entre champignons. Leur intérêt pour la compréhension de certains problèmes phytopathologiques. *Bull. Soc. Mycol. France* 72 : 250-253.

PERESSE M. et LE PICARD D., 1979 – Une expérience de lutte biologique contre la cladosporiose de la tomate. *P.H.M. Revue Horticole* 197 : 64.

PERESSE M. et LE PICARD D., 1980 – *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum*. *Mycopathologia* 71 : 23-30.

RUDAKOV O.L., 1978 – Physiological groups in mycophilic fungi. *Mycologia* 70 : 150-159.

TIRILLY Y., KLOOSTERMAN J., SIPMA G. and KETTENES - VAN DEN BOSCH J.J., 1983 – Fungitoxic sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. *Phytochemistry* 22 : 2082-2083.

TIRILLY Y. et TRIQUE B., 1984 – Production d'enzymes lytiques d'une toxine par le *Hansfordia pulvinata*, hyperparasite du *Cladosporium fulvum*. *Agronomie* 4 : 200.

WALKER J.C., JONES T.G. and HEDGER J.N., 1982 – Preliminary studies on the contact mycoparasite *Nematogonum ferrugineum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 78 : 374-378.